



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0087926
(43) 공개일자 2013년08월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/409 (2006.01) A61K 33/06 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0009193

(22) 출원일자 2012년01월30일

심사청구일자 2012년01월30일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

이정국

서울특별시 마포구 염리동 520(18/7)

염리삼성APT105-1504

김의진

서울 서대문구 홍제 1동 158-19

박현배

경기 안양시 동안구 범계동 목련두산아파트 602동 302호

(74) 대리인

한라특허법인

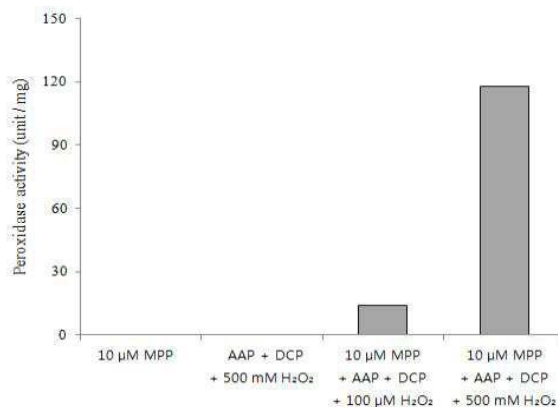
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 마그네슘 프로토포르피린 IX를 함유한 과산화수소 제거제 및 이를 이용한 과산화수소 독성의 저감 방법

(57) 요약

본 발명은 마그네슘 프로토포르피린 IX를 함유한 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂)제거제에 관한 것으로, 보다 상세하게는 광합성 생명체의 엽록소(chlorophyll) 또는 세균엽록소(bacteriochlorophyll) 합성 대사과정의 전구물질인 마그네슘 프로토포르피린 IX(Mg-protoporphyrin IX)가 나타내는 세포 내외에서의 페록시다아제(oxidase) 활성을 통해 세균 또는 포유류 세포에서 나타나는 과산화수소에 의한 독성을 저감시킴으로써 다양한 생명체의 생리활성 물질로 활용될 수 있으며 아울러 자외선(ultraviolet light, UV)에 의한 광독성(photo-toxicity)을 나타내지 않으며 자외선 차단효과를 나타냄으로써 시약, 의약품 및 화장품 소재 등으로 활용될 수 있는 마그네슘 프로토포르피린 IX를 함유한 과산화수소 제거제 및 이를 이용한 과산화수소 독성의 저감 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011K000368

부처명 교육과학기술부

연구사업명 21세기 프론티어연구개발사업

연구과제명 프로토포피린 합성 상위대사과정에서의 산화 스트레스 생성관련 유전체 규명 및 활용기술
개발

주관기관 서강대학교산학협력단

연구기간 2008.05.01 ~ 2012.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

마그네슘 프로토포르피린 IX(Mg-protoporphyrin IX, MPP)를 유효성분으로 하는 세포 내외에서의 과산화수소 제거제.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 마그네슘 프로토포르피린 IX는 페록시다아제 활성화에 의해 과산화수소 제거능력을 갖는 것을 특징으로 하는 세포 내외에서의 과산화수소 제거제.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 세포는 세균 또는 포유류 세포인 것을 특징으로 하는 세포 내외에서의 과산화수소 제거제.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 과산화수소 제거제는 자외선에 의한 광독성을 나타내지 않는 것을 특징으로 하는 세포 내외에서의 과산화수소 제거제.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 과산화수소 제거제는 자외선 차단 효과가 있는 것을 특징으로 하는 세포 내외에서의 과산화수소 제거제.

청구항 6

마그네슘 프로토포르피린 IX를 첨가하여 세포 내외에서의 과산화수소 독성을 저감시키는 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 마그네슘 프로토포르피린 IX는 배지 총량에 대하여 1 ~ 20 μM 의 농도 범위로 첨가하여 세포 내외에서의 과산화수소 독성을 저감시키는 방법.

청구항 8

제 6 항에 있어서, 상기 과산화수소 독성은 세균에서 제거하여 저감시키는 방법.

청구항 9

제 6 항에 있어서, 상기 과산화수소 독성은 포유류 세포에서 제거하여 저감시키는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 마그네슘 프로토포르피린 IX를 함유한 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2) 제거제에 관한 것으로, 보다 상세하게는 세포 내외에서의 페록시다아제(oxidase) 활성을 통해 세균 또는 포유류 세포에서 나타나는 과산화수소에 의한 독성을 저감시킴으로써 다양한 생명체의 생리활성 물질로 활용될 수 있으며 아울러 자외선(ultraviolet light, UV)에 의한 광독성(photo-toxicity)을 나타내지 않으며 자외선 차단효과를 나타냄으로써 시약, 의약품 및 화장품 소재 등으로 활용될 수 있는 마그네슘 프로토포르피린 IX를 함유한 과산화수소 제거제 및 이를 이용한 과산화수소 독성의 저감 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 지구상의 다양한 생명체들 중 동물과 식물, 그리고 일부 미생물들은 호흡을 위해 산소를 최종 전자전달 수용체로 이용한다. 이러한 유기호흡 과정의 부산물로 활성산소(reactive oxygen species, ROS)가 발생하게 되는데, 생체 내에 슈퍼옥사이드(superoxide), 과산화수소, 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical) 등의 활성산소가 발생되면 지질, 단백질, 핵산 등의 생체 구성물질을 손상시키게 된다(Apel and Hirt. 2004. Annu. Rev. Plant Biol. 55: 373-399). 이러한 생체 구성물질의 비가역적 파괴는 노화 현상과 돌연변이에 의한 질병 유발의 주요한 원인이 되고 있다. 따라서 활성산소 발생에 의한 산화스트레스를 극복하기 위해 생명체에는 다양한 항산화효소가 존재하고 있으며, 슈퍼옥사이드 디스뮤테이스(superoxide dismutase, SOD), 카탈라아제(catalase), 페록시다아제 등은 활성산소에 의한 생체 구성물질의 손상을 저감시킨다(Imlay. 2008. Annu. Rev. Biochem. 77: 755-776). SoxR과 같은 특정 단백질이 슈퍼옥사이드의 존재를 인지하면 SOD를 발현시키고, OxyR 단백질이 과산화수소를 감지하면 카탈라아제를 발현시켜 생체 내의 산화스트레스를 저감시키게 된다. SOD에 의해 슈퍼옥사이드가 제거되는 과정에서 과산화수소가 생성되는데, 이러한 과산화수소의 제거를 위해 카탈라아제와 페록시다아제 두 효소(enzyme)가 작용하게 된다(Imlay. 2008. Annu. Rev. Biochem. 77: 755-776). 이 두 효소는 모두 과산화수소를 제거하는 활성을 나타내지만 카탈라아제는 그 반응의 결과물로 물(H₂O)과 산소를 발생시키는데 반해 페록시다아제는 과산화수소 또는 유기 과산화물(organic peroxide)에 의한 전자 공여체(electron donor)의 산화반응을 촉매하는 효소로 물만을 생성하게 된다.
- [0003] 포르피린(porphyrin)은 생체 내에서 혈색소(heme) 및 엽록소(chlorophyll) 등을 구성하는 성분이다(Lucien *et al.* 1995. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1941-1944). 이것은 동물과 일부 미생물에서는 글리신(glycine)과 숙시닐-CoA(succinyl-CoA)의 반응을 통해 생성되기 시작하여 일련의 효소반응을 거쳐 피롤 고리(pyrrole ring)가 형성된다. 이러한 피롤 고리 네 분자가 결합하여 테트라피롤(tetrapyrrole)이 되고 이것은 프로토포르피린 IX(protoporphyrin IX)으로 전환된다. 이 프로토포르피린 IX은 금속 이온과 배위결합 할 수 있는데 환원철 이온(Fe²⁺)과 결합하게 되면 혈색소가 되고, 마그네슘 이온(Mg²⁺)과 결합을 하면 마그네슘 프로토포르피린 IX(Mg-protoporphyrin IX)을 형성하여 엽록소 및 세균엽록소(bacteriochlorophyll) 합성을 위한 대사과정에서 최초의 전구체(intermediate)가 된다(Bolivar *et al.* 1994. J. Mol. Biol. 237: 622-640).
- [0004] 금속 이온을 함유하는 포르피린을 메탈로포르피린(metalloporphyrin)이라고 하는데, 이러한 물질 중 과산화수소 제거 능력을 나타내는 물질들이 보고되어 있다. Manganese(III) *meso*-tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin(MnTBAP) 및 manganese(III) *meso*-tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin(MnMPyP)은 망간(manganese) 이온을 함유하는 포르피린 합성물질로서 슈퍼옥사이드를 제거하는 활성과 함께 과산화수소를 제거하는 카탈라아제 유사 활성이 있음이 알려져 있으며(Day *et al.* 1997. Arch. Biochem. Biophys. 347: 256-262), 상기 MnTBAP가 미토콘드리아(mitochondria)에서 일어나는 과산화수소에 의한 DNA의 파괴 현상을 억제한다는 사실이 보고되었다(Milano and Day. 2000. Nucleic Acids Res. 28: 968-973). 상기 포르피린들이 망간 이온 대신 아연(zinc) 이온을 함유할 경우에도 미세한 과산화수소 제거 활성이 나타나는 것으로 알려져 있다(Day *et al.* 1997. Arch. Biochem. Biophys. 347: 256-262).
- [0005] 종래 이러한 금속 이온을 함유한 메탈로포르피린에 관하여 한국등록특허 제10-0876343호에는 양친매성 또는 수용성 폴리머에 결합한 헴옥시게나제 저해 활성을 갖는 금속 포르피린 유도체, 특히 폴리에틸렌글리콜과 결합한 Zn-프로토포르피린(ZnPP)을 유효성분으로 하는 항종양제에 관해 제안되어 있으나, 아연 프로토포르피린을 함유한 고분자 미셀 복합체는 본 발명의 마그네슘 프로토포르피린과 재료의 특성상 차이가 있으며 효과면에서도 항종양 효과와 페록시다아제 활성 효과는 서로 차이가 있다.
- [0006] 또한 미국등록특허 제6,916,799호에는 슈퍼옥사이드와 과산화수소 등 다양한 산화 종(oxidants)을 제거하고 산화종의 세포 내부 또는 외부 수준을 제어하기 위한 항산화 물질로서의 합성 포르피린과 금속 화합물로 특히 망간 함유 포르피린의 다양한 항산화 효능에 대해 제안되어 있으며, 망간 이온이 철(iron), 구리(copper), 코발트(covalt), 니켈(nickel)로 대체될 수 있음을 청구하였으나, 마그네슘 이온을 함유한 포르피린에 관해서는 기술되지 않는다.
- [0007] 이 밖에도 마그네슘을 함유한 포르피린의 과산화수소 제거 활성에 대한 연구로 페록시다아제의 혈색소 대신 마그네슘 포르피린을 치환한 변형 페록시다아제에 대한 조사가 이루어졌으나(Deguchi *et al.* 1985. J. Biol. Chem. 260: 15542-15546), 마그네슘 포르피린 자체의 생리 활성을 연구한 결과는 아니었다.
- [0008] 과산화수소를 제거하는 효소로 알려진 카탈라아제와 페록시다아제는 모두 단백질로 구성되어 그 정제 과정이 상대적으로 복잡하고, 보관 및 처리 조건에 따라 그 활성(activity)에 대한 안정성(stability)이 매우 낮을 수 있기 때문에 시약이나, 의약품, 화장품 소재로서의 사용에 큰 제약이 따른다. 반면 과산화수소 제거 효과를 나타

내는 합성 화학물질의 경우에는 상기 내용과 같이 효소에서 나타나는 문제점을 해결할 수 있으나, 그 유래가 생체가 아닌 인공적인 물질이기 때문에 낮은 사용 농도에서도 인체에 예기치 않은 독성(toxicity)을 나타낼 수 있으며, 의약품이나 화장품 소재로서 사용되기 위해서는 부정적인 인식의 문제를 극복하여야 하는 단점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 이러한 문제점을 개선하기 위하여, 기존의 마그네슘 함유 프로토포르피린 IX(Mg-protoporphyrin IX, MPP)는 광합성(photosynthesis) 색소 합성을 위한 전구체로만 알려져 있었으며 그 이외의 생리활성이 보고된 바 없었으나, 본 발명에서 제시하는 결과에 따르면 상기 MPP는 페록시다아제(oxidase) 활성을 나타내며, 이를 통하여 과산화수소를 제거하는 능력을 갖는다. 또한 상기 MPP는 엽록소를 광합성에 이용하는 모든 종류의 녹색 식물에 널리 존재하여 인류가 유사 이래로 섭취해온 물질로서, 인체에 대한 독성을 나타낼 우려가 적은 생체 유래 물질이며 자외선(ultraviolet light, UV)에 의한 광독성(photo-toxicity)을 나타내지 않는다는 사실을 알게 되어 발명을 완성하였다.
- [0010] 따라서 본 발명은 마그네슘 프로토포르피린 IX(Mg-protoporphyrin IX, MPP)을 유효성분으로 하는 세포 내외에서의 과산화수소 제거제를 제공하는데 있다.
- [0011] 또한 본 발명은 마그네슘 프로토포르피린 IX를 첨가하여 세포 내외에서의 과산화수소 독성을 저감시키는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 위와 같은 과제 해결을 위해, 본 발명은 마그네슘 프로토포르피린 IX(Mg-protoporphyrin IX, MPP)을 유효성분으로 하는 세포 내외에서의 과산화수소 제거제를 제공한다.
- [0013] 또한 본 발명은 마그네슘 프로토포르피린 IX를 첨가하여 페록시다아제 활성을 통해 세포 내외에서의 과산화수소 독성을 저감시키는 방법을 제공하는데 있다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명에 따르면, 마그네슘 프로토포르피린 IX를 유효성분으로 하는 과산화수소 제거제는 페록시다아제 활성을 통해 세균 또는 포유류 세포에서 나타나는 과산화수소에 의한 독성을 저감시킴으로써 다양한 생명체의 생리활성 물질로 활용될 수 있다.
- [0015] 아울러 자외선(ultraviolet light, UV)에 의한 광독성(photo-toxicity)을 나타내지 않으며 자외선 차단효과를 나타냄으로써 시약, 의약품 및 화장품 소재 등으로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 마그네슘 프로토포르피린 IX의 화학적 구조를 나타낸 것이다.
- 도 2는 마그네슘 프로토포르피린 IX의 페록시다아제(oxidase) 활성 측정 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 마그네슘 프로토포르피린 IX의 처리 시 대장균(*E. coli*) 내에서의 카탈라아제(catalase) 활성의 변화를 나타낸 것이다.
- 도 4는 쥐의 내피세포 세포주인 YPEN-1에서 마그네슘 프로토포르피린 IX에 의한 과산화수소 독성의 제거 효과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 대장균에서 마그네슘 프로토포르피린 IX에 의한 광독성 시험 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0018] 본 발명은 마그네슘 프로토포르피린 IX(Mg-protoporphyrin IX, MPP)를 유효성분으로 하는 세포 내외에서의 과산화수소 제거제를 특징으로 한다.
- [0019] 상기 마그네슘 프로토포르피린 IX는 마그네슘 이온과 배위결합을 하고 있는 프로토포르피린의 일종으로 네 개의 피롤 고리가 결합되어 구성된 테트라피롤 구조로 이루어져 있으며 페록시다아제 활성에 의해 과산화수소를 제거할 수 있는 능력을 가진다. 또한 상기 마그네슘 프로토포르피린 IX는 엽록소 및 세균엽록소 합성 대사과정의 전구물질로, 광합성을 수행하기 위해 엽록소를 합성하는 녹색식물 및 조류(algae)를 비롯한 진핵세포(eukaryote) 생명체에 널리 존재한다. 뿐만 아니라 광합성을 수행하는 원형세포(prokaryote) 미생물로서 광합성을 수행하기 위해 엽록소 또는 세균엽록소를 합성하는 남조류(cyanobacteria), 자색비유황세균(purple non-sulfur bacteria), 자색유황세균(purple sulfur bacteria), 녹색비유황세균(green non-sulfur bacteria), 녹색유황세균(green sulfur bacteria) 또는 헬리오바실러스(heliobacillus) 중 선택되는 것을 사용하여 수득할 수 있다.
- [0020] 또한 상기 과산화수소 제거제는 자외선에 의한 광독성을 나타내지 않으며 자외선 차단 효과를 나타낼 수 있다.
- [0021] 한편 본 발명은 마그네슘 프로토포르피린 IX를 첨가하여 세포 내외에서의 과산화수소 독성을 저감시키는 방법을 특징으로 한다.
- [0022] 상기 마그네슘 프로토포르피린 IX의 과산화수소 독성의 저감 시 시험관 내 페록시다아제 활성은 상기 마그네슘 프로토포르피린 IX의 농도에 비례하여 증가할 수 있다. 그러나 세균 또는 포유류 세포에서의 과산화수소 제거를 위해 상기 마그네슘 프로토포르피린 IX를 처리할 경우, 상기 마그네슘 프로토포르피린 IX의 사용량은 배지 총량에 대하여 1 ~ 20 μM 의 농도 범위인 것이 바람직하다.
- [0023] 이는 1 μM 보다 낮은 경우 상기 마그네슘 프로토포르피린 IX에 의한 과산화수소 제거 효과가 미미하게 나타나며, 20 μM 보다 높은 경우 세포에 대하여 예상하지 못한 독성을 줄 수 있기 때문이다. 가장 바람직하게는 배지 총량에 대하여 2 ~ 10 μM 의 농도 범위인 것을 사용할 수 있다.
- [0024] 또한 마그네슘 프로토포르피린 IX는 세균 또는 포유류 세포의 세포 내외에서 페록시다아제 활성을 나타내어 과산화수소 독성을 제거할 수 있다. 이때 세포 외부에서는 전자공여체의 존재 시 이로부터 전자를 받아 과산화수소를 환원시키는 페록시다아제 활성을 통하여 과산화수소를 제거하는 효능을 나타내며 세포 내부에서도 동일한 작용으로 과산화수소 제거 효과를 나타내어 생체 구성물질의 손상을 저감시킬 수 있다.
- [0025] 이하, 실시예에 의거하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며 본 발명의 내용을 한정하는 것은 아니다.
- [0026] **실시예 1 : 과산화수소 제거제의 제조**
- [0027] 엽록소 및 세균엽록소 합성을 위한 대사과정에서 프로토포르피린 IX부터 클로로필리드(chlorophyllide *a*)에 이르는 일련의 대사과정은 모두 공통적으로 존재하며(Bolivar *et al.* 1994. J. Mol. Biol. 237: 622-640), 마그네슘 프로토포르피린 IX(Mg-protoporphyrin IX, MPP)는 프로토포르피린 IX에 마그네슘 이온을 결합하는 활성을 갖는 magnesium chelatase(ChlM/BchM)의 활성에 의해 생성되는 최초의 전구물질이다(Gibson *et al.* 1999. Biochem. J. 337: 243-251). 따라서 상기 MPP가 존재하는 모든 생명체들에서 그 화학적 구조는 동일하여 이를 수득하는 방법에 특별히 제한은 없다. 이에 본 발명에서는 상업적으로 유통되는 MPP(Frontier scientific, USA)를 사용하였다. 따라서 과산화수소 제거제는 1 ~ 20 μM 의 농도 범위에 해당하는 상기 MPP 및 이를 용해시켜 사용하기 위한 용매인 에탄올(ethanol, EtOH)을 배지 총량에 대하여 2000분의 1 비율로 첨가하여 제조하였다.
- [0028] **실험예 1 : MPP의 페록시다아제 활성 측정**
- [0029] 마그네슘 프로토포르피린 IX(Mg-protoporphyrin IX, MPP)의 페록시다아제(oxidase) 활성을 측정하는 다양한

방법이 존재하지만, MPP의 흡광도와 반응산물의 흡광도가 일치하지 않아 정확한 측정이 가능한 방법인 아미노엔티피린(4-aminoantipyrine, AAP), 디클로로페놀(2,4-dichlorophenol, DCP) 및 과산화수소의 반응을 이용한 페록시다아제 활성 측정법(Maria *et al.* 2001. Appl. Environ. Microbiol. 67: 4512-4519)을 이용하여 측정하였다. 과산화수소는 페록시다아제의 존재 시 디클로로페놀이 아미노엔티피린과 시프 염기(Schiff base)를 형성하여 퀴논(quinone)계열의 적색 물질인 퀴노네민(quinoneimine)을 생성하게 된다(Jennifer *et al.* 1992. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 518-523). 퀴노네민의 생성 정도는 510 nm에서의 흡광도를 측정하여 결정하고, 이를 통해 페록시다아제의 활성 정도를 측정할 수 있다. 따라서 510 nm에서의 흡광도 변화를 통해 반응 생성물을 측정하였으며, 페록시다아제 활성도의 단위(unit)를 1분당 만들어진 반응 생성물의 μmole 값으로 정의하였다.

[0030] 이 반응을 위한 버퍼(buffer) 용액으로써 100 mM 농도의 인산칼륨(potassium phosphate) 버퍼[pH 7.0]를 사용하였고, 5 mM 농도의 디클로로페놀 및 3.2 mM 농도의 아미노엔티피린을 첨가하였다. 도 2는 이러한 조건에서 MPP(10 μM)의 존재 여부에 따른 페록시다아제의 활성을 측정한 결과를 나타낸 것이다. 그 결과 디클로로페놀, 아미노엔티피린 및 과산화수소만을 혼합하여 주었을 때 흡광도의 변화가 나타나지 않았고, 상기 MPP만을 넣어 반응하였을 때에도 흡광도의 변화가 나타나지 않았다. 하지만 디클로로페놀, 아미노엔티피린, 과산화수소 및 상기 MPP를 모두 첨가하였을 경우 시간에 따른 흡광도의 변화가 관찰되었다. 100 μM 의 낮은 과산화수소 농도에서도 상기 MPP의 페록시다아제 활성이 관찰되었으며, 기질을 포화시켰을 경우 MPP 1 mg당 약 120 units(unit = $\mu\text{mole quinoneimine/min}$)의 페록시다아제 활성이 나타났다. 따라서 상기 MPP가 페록시다아제 활성을 나타내며 이를 통해 과산화수소를 제거할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

[0031]

[0032] 실험예 2 : 세균에서의 MPP에 의한 과산화수소 독성 제거효과 시험

[0033] 세균 배양액에서도 상기 실험예 1에서와 같이 상기 MPP가 과산화수소 제거 효과를 나타내는지 여부를 확인하기 위해 MPP 처리에 따른 대장균(*E. coli*)의 카탈라아제 활성 변화를 측정하였다. 대장균은 두 종류의 카탈라아제를 함유하고 있으며, 이 중 KatE(HPII)는 시그마 팩터(sigma factor)인 RpoS의 조절을 받는 반면 KatG(HPI)은 OxyR에 의해 주된 조절을 받는다(Schellhorn. 1995. FEMS Microbiol. Lett. 131: 113-119). 세포 내부의 과산화수소 농도가 증가할 경우 KatG의 발현은 OxyR 단백질의 전사 활성 조절에 의해 증가하게 된다(Imlay. 2008. Annu. Rev. Biochem. 77: 755-776). 따라서 MPP가 배지 내부의 과산화수소를 제거하여 그 농도를 낮추게 되면 과산화수소에 의한 카탈라아제의 활성 증가 정도가 감소할 것이다. 카탈라아제의 활성은 240 nm에서의 흡광도 변화를 측정하여 과산화수소의 시간에 따른 감소 정도를 통해 결정하였다. 50 mM 농도의 인산칼륨 (potassium phosphate) 버퍼[pH 7.0]를 사용하였고, 20 mM 농도의 과산화수소를 기질로 첨가하였다. 여기에 각 농도의 MPP를 혼합하여 준 후 240 nm에서 5분 동안 흡광도의 변화량을 측정하였다. 과산화수소의 흡광계수는 $43.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 으로 계산하였고, 카탈라아제 활성을 $\mu\text{mole/min} \cdot \text{mg protein}$ 의 단위로 나타내었다(Park *et al.* 2004. J. Bacteriol. 186: 3304-3312). 도3은 과산화수소 및 MPP 처리 시 대장균 DH5 α 의 카탈라아제 활성 변화를 측정한 결과이다. 상단 (가)에서는 각각 50 μM 의 과산화수소 농도에서, 대장균의 접종 후 지수기(log phase)에서 과산화수소와 MPP를 동시에 처리하였고 마그네슘 함유 프로토포르피린 IX 이 배지 내에 10 μM 의 농도로 첨가된 경우와 첨가되지 않은 대조군에 대하여 30분, 60분 후 각각 세포를 분쇄하고 조추출액(crude extract)을 수득하여 시간에 따른 카탈라아제의 활성 변화 정도를 측정하였다. 50 μM 농도의 과산화수소 처리에 따라 카탈라아제의 활성이 증가하는 현상이 관찰되었으며, MPP를 동시에 처리한 경우 그렇지 않은 대조군에 비해 낮은 카탈라아제의 활성이 관찰되었다. 하단 (나)에서는 각각 50 μM 의 과산화수소 농도에서, 과산화수소 및 MPP의 처리 시간을 60분으로 고정하였고, 마그네슘 함유 프로토포르피린 IX 이 배지 내에 2 μM 에서 10 μM 까지의 서로 다른 농도로 첨가된 경우와 첨가되지 않은 대조군에 대하여 카탈라아제의 활성 차이를 측정하였다. 그 결과 MPP의 농도 증가에 따라 대장균 내 카탈라아제의 활성이 점진적으로 낮아지는 현상을 관찰할 수 있었다. 따라서 세균의 세포 배양액에 MPP를 처리할 경우 과산화수소에 의한 독성을 감소시켜 줄 수 있음을 확인하였다.

[0034]

[0035] 실험예 3 : 쥐의 내피세포에서의 MPP에 의한 과산화수소 독성 제거효과 시험

[0036] MPP의 과산화수소 제거 활성에 의해 과산화수소에 의한 세포 독성이 실제로 저감되는지의 여부를 쥐(rat)의 내피세포(endothelial cell) 세포주(cell-line)인 YPEN-1(ATCC CRL-2222)을 이용하여 시험하였다. YPEN-1 세포주의 성장을 위해 5 wt%의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium) 배지를 사용하였다. 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5 vol%의 이산화탄소 (CO_2)를 제공하는 조건에서 접종 후 2일간 성장시

켰다. 기존 배지를 제거한 이후 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지로 교환하여 준 후 MPP가 처리되지 않는 두 대조군 (가, 나)에 모두 MPP를 용해시켜 사용하기 위한 용매인 에탄올(ethanol, EtOH)을 배지 총량에 대하여 2000분의 1 비율로 첨가하였다. 대조군 (가)에는 용매인 에탄올만을 첨가하였고 대조군 (나)에는 에탄올과 함께 50 μ M 농도의 과산화수소를 처리하였다. 아울러 MPP의 효능을 시험하기 위한 실험군 (다)에는 50 μ M 농도의 과산화수소 및 에탄올에 용해되어 있는 상태의 6 μ M MPP를 동시에 첨가하였다. 시약 처리 후 12시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 5 vol%의 이산화탄소를 제공하는 조건에서 배양하고, 세포의 사멸 정도를 공초점 현미경(confocal microscope)을 이용하여 확인하였다. 도 4는 쥐의 내피세포 세포주인 YPEN-1에서 마그네슘 프로토포르피린 IX에 의한 과산화수소 독성의 제거 효과를 나타낸 것으로 50 μ M 농도의 과산화수소가 처리된 대조군 (나)의 경우 과산화수소의 독성에 의해 약 30% 내외의 세포가 사멸한 것으로 나타났다. 반면 50 μ M 농도의 과산화수소 및 6 μ M 농도의 MPP를 동시에 첨가한 실험군 (다)의 경우에는 에탄올만이 첨가된 대조군 (가)와 비슷하게 대부분의 세포가 생존한 것으로 관찰되었다. 따라서 포유류 세포의 배양액에 MPP를 처리할 경우 과산화수소에 의한 독성을 감소시켜 줄 수 있음을 확인하였다.

[0037]

[0038]

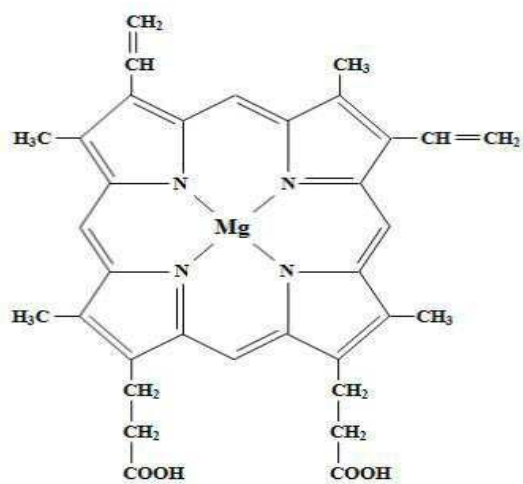
실험예 4 : MPP의 자외선에 의한 광독성 시험

[0039]

포르피린(porphyrin) 계열 물질 중 일부는 자외선에 노출될 경우 독성을 나타내는 이른바 광독성(photo-toxicity)을 갖는 것으로 알려져 있다(Gibson *et al.* 1997. Photochem. Photobiol. 65: 416-421). MPP 또한 포피린 계열의 물질이기 때문에 이 물질이 광독성을 갖는다면 그 용법에 있어 제약이 따를 수 있다. 이에 MPP의 광독성 여부를 시험하고자 하였다. 자외선(ultraviolet light, UV)은 200 nm 에서 400 nm 사이의 파장을 갖는데, 이 중 200-290 nm의 파장을 갖는 UV-C와 290-320 nm의 파장을 갖는 UV-B에 비해 320-400 nm의 파장에 해당하는 UV-A는 일광자외선의 약 90%에 해당하며, 상대적으로 파장이 길어 그 투과성이 좋기 때문에 조직 내부까지 파고 들어갈 수 있다. 도 5는 대장균을 이용하여 MPP의 광독성 여부를 시험 결과를 나타낸 것으로 (가)의 결과를 얻기 위해 에탄올, 테트라사이클린(tetracycline), 프로토포르피린 IX(protoporphyrin IX) 그리고 MPP를 배지 내에 1.2 μ M의 농도로 첨가하고 0.045 J/cm²의 에너지로 10분간 UV-A 파장의 빛을 조사하여 약 10² CFU(colony forming unit)가 되도록 LB(Luria-Bertani) 평판 배지에 도말하여 18시간 후 나타난 콜로니(colony)의 수를 측정하였다. 동시에 각각 같은 시약을 처리하였지만 빛을 조사하지 않은 대조군들을 시험하였다. 에탄올은 처리된 시약들을 녹이기 위해 사용된 용매로서 동시에 시험하였고, 테트라사이클린 및 프로토포르피린 IX 은 광독성을 갖는다는 사실이 알려져 있는 물질(Verma *et al.* 2008. Toxicol. In Vitro 22: 249-253; Gibson *et al.* 1997. Photochem. Photobiol. 65: 416-421)이기 때문에 대조군으로서 동시에 시험하였다. 그 결과는 빛을 조사하지 않은 경우와 콜로니의 수를 비교하여 상대적인 생존율로 나타내었다. 이와 같은 조건에서 테트라사이클린 및 프로토포르피린 IX이 광독성을 나타낸 반면 MPP의 경우 광독성을 나타내지 않는 것으로 나타났다. 상기 도 5에서 (나)의 결과는 MPP가 배지 내에 각각 1.2 μ M 및 6 μ M 의 농도로 첨가된 경우와 첨가되지 않은 대조군에 대하여 0.54 J/cm²의 에너지로 UV-A 파장의 빛을 조사하여 시험하였다. 이 조건의 자외선은 매우 강하여 대장균을 약 80% 정도 사멸시켰으나, MPP가 존재하는 경우에는 오히려 세포를 자외선으로부터 보호하는 효과를 나타내었다. 따라서 약 420 nm의 파장에서 최대흡광도를 갖는 MPP는 UV-A 파장의 빛을 흡수하지만, 그 빛에 의해 광독성을 나타내지 않으며 오히려 자외선 차단 효과가 있음을 확인하였다.

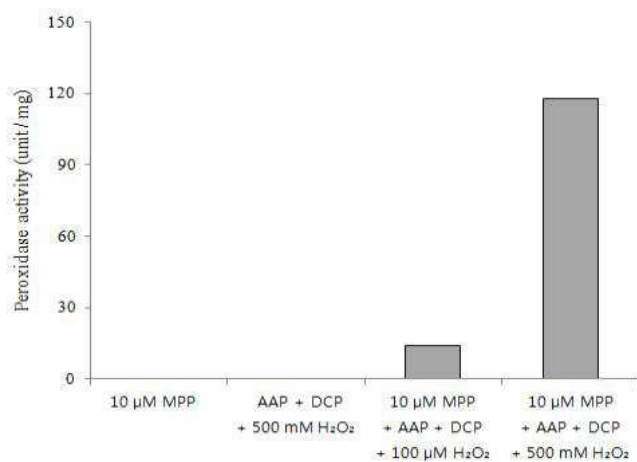
도면

도면1

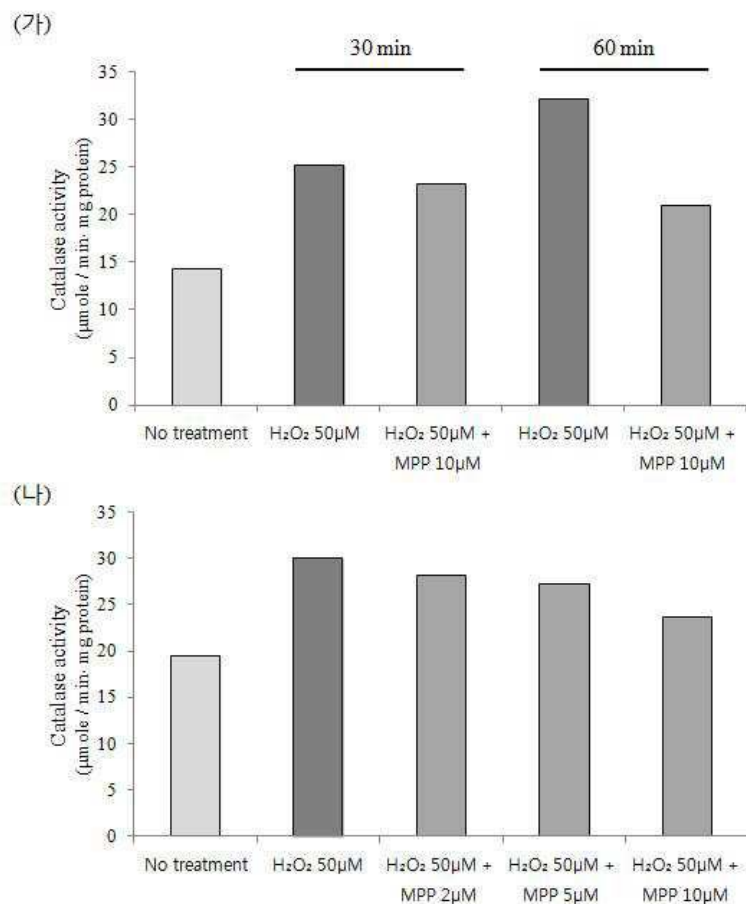


Mg-protoporphyrin IX

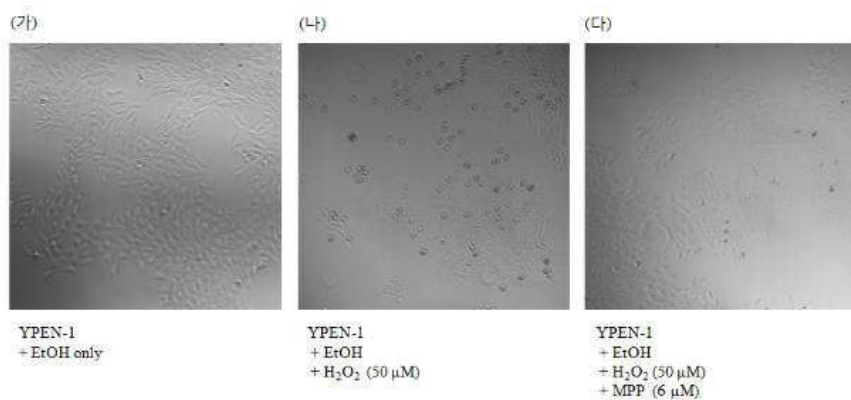
도면2



도면3



도면4



도면5

